

PCT/JP03/14263

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

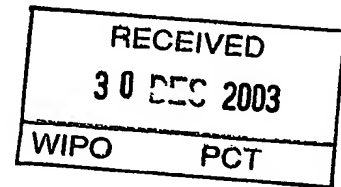
10.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 5月23日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-147035
[ST. 10/C]: [JP2003-147035]



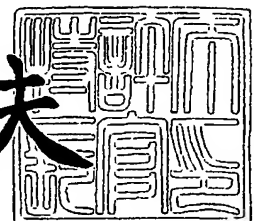
出 願 人
Applicant(s): 森永乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P000011237

【提出日】 平成15年 5月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 35/20

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市山城町西浜傍示 1 8 0 番
徳島文理大学 健康科学研究所内

【氏名】 勝沼 信彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号
森永乳業株式会社 栄養科学研究所内

【氏名】 山田 明男

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号
森永乳業株式会社 栄養科学研究所内

【氏名】 川口 靖

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号
森永乳業株式会社 栄養科学研究所内

【氏名】 高倉 南津子

【特許出願人】

【識別番号】 000006127

【氏名又は名称】 森永乳業株式会社

【代理人】

【識別番号】 300019386

【氏名又は名称】 重兼 彰夫

【電話番号】 046(252)3026

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 064301

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0003998

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プロテアーゼ阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カゼインを加水分解酵素で加水分解することによって得ることができ、かつ、システインプロテアーゼ阻害作用を有するカゼイン加水分解物を有効成分として含有するシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 2】 前記加水分解酵素が、動物又は微生物由来の加水分解酵素から選択される 1 種又は複数種である請求項 1 に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 3】 前記カゼイン加水分解物の分解率が 12 % 以下である請求項 1 又は請求項 2 に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 4】 前記カゼイン加水分解物の数平均分子量が 600 ～ 5000 ダルトンである請求項 1 ～ 請求項 3 のいずれか一項に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 5】 カゼイン加水分解物を全量に対して 0.005 質量% 以上含有する請求項 1 ～ 請求項 4 のいずれか一項に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 6】 システインプロテアーゼが関与する疾患の予防・治療剤である請求項 1 ～ 請求項 5 のいずれか一項に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 7】 システインプロテアーゼが関与する疾患が、骨粗鬆症又は悪性腫瘍性高カルシウム血症である請求項 6 に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 請求項 7 のいずれか一項に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤を添加してなる飲食品組成物又は飼料組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カゼイン加水分解物を有効成分として含有するシステインプロテアーゼ阻害剤に関するものであり、骨粗鬆症、悪性腫瘍性高カルシウム血症等の予

防・治療剤、並びに飲食品及び飼料等に利用することが可能なシステインプロテアーゼ阻害剤である。

【0002】

【従来の技術】

活性中心にチオール基を有する蛋白分解酵素はシステインプロテアーゼ（チオールプロテアーゼ）と総称されている。カテプシンL、カテプシンBは、カルシウム依存性中性プロテアーゼ（CAMP）、パパイン、フィシン、プロメライン等とともに代表的なシステインプロテアーゼの一つである。そしてこれらシステインプロテアーゼに対して阻害作用を有する物質は、システインプロテアーゼが関与するとされる疾患、例えば筋ジストロフィー、筋萎縮症、心筋梗塞、脳卒中、アルツハイマー病、頭部外傷時の意識障害や運動障害、多発性硬化症、末梢神経のニューロパシー、白内障、炎症、アレルギー、劇症肝炎、骨粗鬆症、高カルシウム血症、乳癌、前立腺癌、前立腺肥大症の治療薬として、あるいは癌の増殖抑制、転移予防薬、血小板の凝集阻害薬として期待される。また、近年に至り、勝沼等の研究によってカテプシンL、カテプシンBと骨粗鬆症乃至悪性腫瘍性高カルシウム血症の関係が解明され、それによって、とりわけカテプシンL阻害剤の骨粗鬆症治療剤乃至悪性腫瘍性高カルシウム血症治療剤としての医薬への適用が注目されつつある（例えば、非特許文献1を参照）。骨組織においては、骨芽細胞（osteoblast）による骨形成と、破骨細胞（osteoclast）による骨吸収が生涯を通じて行われており、成長期には骨形成が骨吸収を上回ることにより骨重量が増加し、一方老年期には逆に骨吸収が骨形成を上回るために骨重量が減少し、骨粗鬆症の発症となる。これら骨粗鬆症の原因としては様々なものがあるが、特に骨崩壊（骨吸収）を主原因の一つとして挙げることができる。これを更に2つの原因に分けると次のようになる。即ち、一つはカルシウムの吸収と沈着不全に起因するものであり、更に詳しくはカルシウムの供給量、転送、吸収、及び沈着が関係するものであり、ビタミンD誘導体、女性ホルモン（エストロゲン）等が関与していると考えられる。いま一つは、骨支持組織であるコラーゲンの分解促進を内容とするものであり、破骨細胞内リソゾームから分泌されるシステインプロテアーゼ群、中でも特にカテプシンL、カテプシンBによる骨コラーゲン分解

が主たる原因である。破骨細胞内のリソゾームから分泌されたこれらカテプシン L 及び B は骨組織中のコラーゲンの分解を促進し、それによって古い骨は溶解され、ヒドロキシプロリンとともにカルシウムが血中に遊離放出させられる。従って、カテプシン L 及び B のコラーゲン分解能を阻害することによって過剰な骨崩壊を防止することが可能であり、ひいては骨粗鬆症の治療が可能となる。これら骨粗鬆症の治療剤としては、エストロゲン、タンパク同化ホルモン、カルシウム剤、ビタミン D、カルシトニン、あるいはビスホスホネート等が知られている。またカテプシン L 阻害、カテプシン B 阻害のいわゆるシステインプロテアーゼ阻害を作用機序とする骨粗鬆症治療剤についてもいくつかのシステインプロテアーゼ阻害剤をもちいた骨粗鬆症治療剤の開発が進められているが、さらなる骨粗鬆症治療剤の開発が望まれている。

【0003】

一方、高カルシウム血症は、血清中のカルシウム濃度が正常値以上となる代謝異常であり、腫瘍患者に多く見受けられる。これを放置した場合、患者の寿命は 10 日程度であると言われている。原因の多くは腫瘍の骨転移である。腫瘍が骨に転移すると、骨破壊が起こり、カルシウムが血中に放出される。このカルシウムは腎臓で処理されるが、骨破壊のスピードが腎臓の処理能力を上回ったとき、高カルシウム血症の発現となる。治療方法としては、フロセミドを併用した生理的食塩水の輸液を用いることにより腎臓からのカルシウム排泄を促進する方法や、骨粗鬆症治療薬であるカルシトニンを使用する方法等が知られている。即ち、骨吸収を抑制するがごとき骨粗鬆症治療薬は悪性腫瘍性高カルシウム血症の治療剤としても有効であるといえる。

【0004】

本発明者らにより、このような目的に使用し得るシステインプロテアーゼ阻害剤としてすでに以下の公報が開示されている。

- (1) カテプシン L 特異的阻害ポリペプチド (特許文献 1)
- (2) チオールプロテアーゼ阻害剤 (特許文献 2)
- (3) バリン誘導体およびその用途 (特許文献 3)
- (4) チオールプロテアーゼ阻害剤 (特許文献 4)

(5) FA-70C1物質 (特許文献5)

(6) FA-70D物質、その製造法及びその用途 (特許文献6)

しかしながら、食品素材として利用の点から、より汎用性の高いシステインプロテアーゼ阻害剤の開発が望まれていた。

【0005】

他方、これまでに、母乳中にプロテアーゼ阻害物質が存在することが知られている。母乳に含まれるプロテアーゼ阻害物質として知られているものとしては、 α_1 -アンチキモトリプシン、 α_1 -アンチトリプシンが挙げられ、インター α_2 -トリプシン阻害物質、 α_2 -アンチプラスミン、 α_2 -マクログロブリン、アンチトロンビンIII、アンチロイコプロテアーゼなどの阻害剤等も微量含まれている (例えば、非特許文献2を参照)。

【0006】

乳中において、システインプロテアーゼ阻害活性を有するタンパク質については、すでに以下の公報が開示されている。

(1) 牛初乳由来の糖鎖を有する分子量約 5.7 kDa の新規システインプロテアーゼインヒビター (特許文献7)

(2) 牛初乳由来の分子量 16 ± 2 kDa 又は 13 ± 2 kDa の新規システインプロテアーゼインヒビター (特許文献8)

(3) 人乳由来の分子量 16 ± 2 kDa 又は 13 ± 2 kDa の新規タンパク質およびその製造方法 (特許文献9)

【0007】

ほ乳類乳に多量に含有されるタンパク質として、ラクトフェリン及び β -カゼインなどが挙げられる。カゼインは、 α_s -カゼイン、 β -カゼイン及び κ -カゼインに分類され、人乳中のカゼインは、 β -カゼインがほとんどであり、 α_s -カゼインは存在しないか、又は痕跡程度認められるのみであるが、牛乳中のカゼインは、 α_s -カゼイン、 β -カゼインをほぼ等量含む。カゼインは栄養成分としての働きの他に、最近ではそのタンパク質の一次構造に潜在的に含まれるカルシウム吸収促進作用やマクロファージ貪食活性化作用を有する生理活性ペプチド等が発見され、注目を集めている。また、カゼインは高い栄養価とともに、乳

製品の原材料として、例えば、チーズ、ヨーグルト、スキムミルク等の様々な食品に加工処理され、我々の食生活に寄与している。

【0008】

カゼインを利用した発明としては、本出願人により、すでに κ -カゼイン又は κ -カゼインの加水分解物を有効成分とする動脈硬化防止剤（特許文献10）が開示されている。

【0009】

また、ヒト乳から分離した β -カゼイン若しくはその組換え形態又はそのいずれかの水解物は、インフルエンザ菌のヒト細胞への付着の阻害（特許文献11）、及び哺乳動物細胞のRSウイルス（Respiratory Syncytial Virus）感染阻害（特許文献12）が開示されている。

【0010】

更に、 β -カゼイン加水分解物のアンジオテンシン変換酵素阻害活性（特許文献13及び14）が開示されている。

【0011】

しかしながら、カゼイン及びその部分ペプチドがシステインプロテアーゼ阻害作用を有することは知られていない。

【0012】

【特許文献1】

特開平7-179496号公報

【特許文献2】

特開平9-221425号公報

【特許文献3】

特開2001-139534号公報

【特許文献4】

特開平7-242600号公報

【特許文献5】

特開2000-72797号公報

【特許文献6】

国際公開第 97/31122 号パンフレット

【特許文献 7】

特開平 7-2896 号公報

【特許文献 8】

特開平 7-126294 号公報

【特許文献 9】

特開平 10-80281 号公報

【特許文献 10】

特開平 8-81388 号公報

【特許文献 11】

特表平 10-500101 号公報

【特許文献 12】

特表平 10-500100 号公報

【特許文献 13】

特開平 6-128287 号公報

【特許文献 14】

特開平 6-277090 号公報

【0013】

【非特許文献 1】

勝沼信彦著、「BIO media」、第 7 巻、第 6 号、第 73～77 ページ、1992 年

【非特許文献 2】

清澤功著、「母乳の栄養学」、金原出版、第 80～81 ページ

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、食品素材として幅広く利用することが可能であり、骨粗鬆症、悪性腫瘍性高カルシウム血症等の予防・治療剤、並びに各種飲食品及び飼料等に利用することが可能な、汎用性の高いシステインプロテアーゼ阻害剤を提供することを目的としている。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、抗原性のない、安全な素材として利用する事が可能なシステインプロテアーゼ阻害物質を鋭意検索した結果、乳由来のタンパク質であるカゼインの加水分解物にシステインプロテアーゼ阻害活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0016】

本発明の要旨は以下の(1)～(8)のとおりである。

(1) カゼインを加水分解酵素で加水分解することによって得ることができ、かつ、システインプロテアーゼ阻害作用を有するカゼイン加水分解物を有効成分として含有するシステインプロテアーゼ阻害剤。

(2) 加水分解酵素が、動物又は微生物由来の加水分解酵素から選択される1種又は複数種である前記(1)に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

(3) カゼイン加水分解物の分解率が12%以下である前記(1)又は(2)に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

(4) カゼイン加水分解物の数平均分子量が600～5000ダルトンである前記(1)～(3)のいずれかに記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

(5) カゼイン加水分解物を全量に対して0.005質量%以上含有する前記(1)～(4)のいずれかに記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

(6) システインプロテアーゼが関与する疾患の予防・治療剤である前記(1)～(5)のいずれかに記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

(7) システインプロテアーゼが関与する疾患が、骨粗鬆症又は悪性腫瘍性高カルシウム血症である前記(6)に記載のシステインプロテアーゼ阻害剤。

(8) 前記(1)～(7)のいずれかに記載のシステインプロテアーゼ阻害剤を添加してなる飲食品組成物又は飼料組成物。

【0017】

【発明の実施の形態】

次に、本発明の好ましい実施態様について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の好ましい実施態様に限定されず、本発明の範囲内で自由に変更することが

できるものである。尚、本明細書において百分率は特に断りのない限り質量による表示である。

【0018】

本発明は、カゼイン加水分解物を有効成分として含有するシステインプロテアーゼ阻害剤である。本発明に用いられるカゼインとしては、市販の各種カゼイン、若しくはヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ等の乳等から常法（例えば、尿素硫酸法）により単離したもの、又は遺伝子組換え技術等によって生産されたものであってよい。

【0019】

カゼインは、 α -カゼイン、 β -カゼイン、及び κ -カゼインに分類されるが、本発明にはいずれのカゼインも用いることができ、好ましくは β -カゼイン又は κ -カゼインを用いることができる。

【0020】

次に、カゼインを加水分解酵素で加水分解する方法を説明する。前記のような原料カゼインを水又は温湯に分散し、溶解する。該溶解液の濃度は格別の制限はないが、通常、蛋白質換算で5～15%前後の濃度範囲にするのが効率性及び操作性の点から望ましい。

【0021】

前記カゼインを含有する溶液を70～90℃で10分間～15秒間程度加熱殺菌することが、雑菌汚染による変敗防止の点から望ましい。

【0022】

次いで、前記カゼインを含有する溶液にアルカリ剤又は酸剤を添加し、pHを使用する加水分解酵素の至適pH又はその付近に調整することが好ましい。本発明の方法に使用するアルカリ剤又は酸剤は、食品又は医薬品に許容されるものであれば如何なるアルカリ剤又は酸剤であってもよい。具体的には、アルカリ剤としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム等を、酸剤としては、塩酸、クエン酸、リン酸、酢酸等を例示することができる。

【0023】

次いで、前記カゼイン溶液に加水分解酵素溶液を添加する。加水分解酵素は蛋

白質を加水分解する酵素であれば特に制限されず、動物由来、又は微生物由来の酵素であることが好ましい。また、酵素はエンドペプチダーゼであることが好ましい。エンドペプチダーゼとしては、パンクレアチン、ペプシン、トリプシン、エラスターゼ等、種々の酵素を使用することができる。尚、「由来」とは、元来上記の生物が保持していることを意味し、採取原を意味するものではない。例えば、バチルス・ズブチリスが産生するプロテアーゼをコードする遺伝子をエシェリヒア・コリに導入し、同遺伝子を発現させることにより製造したプロテアーゼは、バチルス・ズブチリス「由来」である。

【0024】

前記の酵素をカゼイン 1 g 当たり 20～200 活性単位（この単位については後記する）の割合で添加する。活性単位は、次の方法により測定する。プロテアーゼを含有する粉末を 0.2 g / 100 ml の割合で 0.1 モルのリン酸緩衝液（pH 7.0）に分散又は溶解して酵素溶液を調製する。一方、ロイシルパラニトロアニリド（国産化学社製。以後 Leu-pNA と記載する）を 0.1 モルのリン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解して 2 mM の基質溶液を調製する。酵素溶液 1 ml に基質溶液 1 ml を添加し、37℃で 5 分間反応させ、その後 30% の酢酸溶液 2 ml を添加して反応を停止させる。反応液をメンブランフィルターで濾過し、波長 410 nm で濾液の吸光度を測定する。プロテアーゼの活性単位は、1 分間に 1 μ mol の Leu-pNA を分解するのに必要な酵素量を 1 活性単位と定義し、次式により求める。

【0025】

$$\text{活性単位（粉末 1 g 当たり）} = 20 \times (A/B)$$

ただし、前記の式において A 及び B は、それぞれ波長 410 nm における試料の吸光度及び 0.25 mM パラニトロアニリンの吸光度を示す。

【0026】

本発明において用いる加水分解酵素は 1 種でもよく、2 種以上用いてもよい。2 種以上の酵素を用いる場合は、それぞれの酵素反応は同時に行ってもよく、別々に行ってもよい。

【0027】

酵素を添加した溶液を、酵素の種類に応じて適当な温度、例えば30～60℃、望ましくは45～55℃に保持してカゼインの加水分解を開始する。加水分解反応時間は、酵素反応の分解率をモニターしながら、好ましい分解率に達するまで反応を続ける。尚、本発明において、カゼイン加水分解物の分解率は、6～12%が特に好適である。ここで、カゼイン加水分解物の分解率が6%以上であると、より分解が進んでいると考えられるために、一定の条件で分解を行うことがより容易であることから、分解率は6%以上が好ましい。

【0028】

尚、蛋白質の分解率の算出方法は、ケルダール法（日本食品工業学会編、「食品分析法」、第102頁、株式会社光琳、昭和59年）により試料の全窒素量を測定し、ホルモール滴定法（満田他編、「食品工学実験書」、上巻、第547ページ、養賢堂、1970年）により試料のホルモール態窒素量を測定し、これらの測定値から分解率を次式により算出する。

【0029】

$$\text{分解率 (\%)} = (\text{ホルモール態窒素量} / \text{全窒素量}) \times 100$$

酵素反応の停止は、加水分解液中の酵素の失活により行われ、常法による加熱失活処理により実施することができる。加熱失活処理の加熱温度と保持時間は、使用した酵素の熱安定性を考慮し、十分に失活できる条件を適宜設定することができるが、例えば、80～130℃の温度範囲で30分間～2秒間の保持時間で行うことができる。尚、得られた反応液は必要に応じてクエン酸等の酸によりpHを5.5～7の範囲に調整しても良い。

【0030】

本明細書において、数平均分子量とは、数平均分子量に関する文献（社団法人高分子学会編、「高分子科学の基礎」、第116乃至119頁、株式会社東京化学同人、1978年）に記載されるとおり、高分子化合物の分子量の平均値を次のとおり異なる指標に基づき示すものである。即ち、蛋白質加水分解物等の高分子化合物は不均一な物質であり、かつ分子量に分布があるため、蛋白質加水分解物の分子量は、物理化学的に取り扱うためには、平均分子量で示す必要があり、数平均分子量（以下、 M_n と略記することがある。）は、分子の個数についての

平均であり、ペプチド鎖 i の分子量が M_i であり、その分子数を N_i とすると、次の式 (数 1) により定義される。

【0031】

【数 1】

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} M_i N_i}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i}$$

【0032】

尚、本発明において数平均分子量を測定する場合は、高速液体クロマトグラフィーにより分子量分布を測定し、検量線から GPC 分析システムによりデータ解析することにより算出した。すなわち、カラムとして、ポリハイドロキシエチル・アスパルアミド・カラム [Poly Hydroxyethyl Aspartamide Column : ポリ・エル・シー (Poly LC) 社製。4.6mm×400mm] を使用し、20mM 塩化ナトリウム、50mM ギ酸により、溶出速度 0.5ml/分 で溶出した。検出は UV 検出器 (島津製作所。215nm) を使用して分子量分布を測定し、分子量が既知のサンプルにより検量線を作成し、GPC 分析システム (島津製作所製) によりデータ解析し、数平均分子量を求めた。尚、本発明において、カゼイン加水分解物の数平均分子量は、600～5000 ダルトン が特に好適である。ここで、カゼイン加水分解物の数平均分子量が 5000 ダルトン 以下である場合、カゼインはより分解され易い条件であることから、本願発明のシステインプロテアーゼ阻害活性を有するカゼイン加水分解物を得ることがより容易であるために、数平均分子量は 5000 ダルトン 以下が好ましい。

【0033】

得られたカゼイン加水分解物を含有する溶液は、そのまま使用することも可能であり、また、必要に応じて、この溶液を公知の方法により濃縮した濃縮液、更に、この濃縮液を公知の方法により乾燥した粉末、として使用することもできる。

【0034】

上記のようにして得られるカゼイン加水分解物は、システインプロテアーゼ阻害作用を有する。したがって、システインプロテアーゼ阻害作用を指標として、カゼイン加水分解物を製造する際の条件は、適宜設定することができる。

【0035】

本発明に用いることができるカゼイン加水分解物は、カテプシンB、L及びパパン等のシステインプロテアーゼに対して阻害活性を有する。システインプロテアーゼ阻害活性は、Barrett等の方法 [メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第80巻、第535～561ページ、1981年] に従って測定することができる。すなわち、0.1M酢酸緩衝液 pH 5.5 に溶解したカゼイン消化物溶液に、基質として Z-P h e -A r g -M C A (最終濃度 20 mM: ペプチド研究所社製) を添加し、システインプロテアーゼ (本試験ではパパン: シグマ社製) 溶液 (最終濃度: 15 units/ml) を添加して混合し、37℃で10分間反応させた後、消化を受けた基質から遊離した AMC の蛍光強度 (励起波長: 370 nm、発光波長: 460 nm) を蛍光分光度計 (日立社製) を用いて測定した。

【0036】

本発明のシステインプロテアーゼ阻害剤はカゼイン加水分解物、若しくはこれらを製剤学的に許容される製剤担体と組合わせて、経口的、又は非経口的にヒトを含む哺乳動物に投与することができる。本発明の製剤の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択でき、具体的には、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤等を例示できる。製剤化にあたっては製剤担体として通常の薬剤に汎用される賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、注射剤用溶剤等の添加剤を使用できる。

【0037】

本発明の製剤中に含まれるカゼイン加水分解物の量は特に限定されず適宜選択すればよいが、例えばいずれも通常製剤中に 0.005～80 質量%、好ましくは 0.05～60 質量%とするのがよい。

【0038】

本発明の製剤の投与方法は特に限定されず、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、患者の症状の程度等に応じて決定される。本発明の製剤の有効成分の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件等により適宜選択される。通常有効成分としてのカゼイン加水分解物の量は、 $0.1 \sim 1200 \text{ mg/kg/日}$ 、好ましくは $10 \sim 500 \text{ mg/kg/日}$ の範囲となる量を目安とするのが良く、1日1回又は複数回に分けて投与することができる。

【0039】

本発明のシステインプロテアーゼ阻害剤は、システインプロテアーゼが関与する疾患、例えばアレルギー、筋ジストロフィー、筋萎縮症、心筋梗塞、脳卒中、アルツハイマー病、多発性硬化症、白内障、骨粗鬆症、悪性腫瘍性高カルシウム血症、前立腺肥大症、乳癌、前立腺癌等の予防・治療剤、若しくは癌細胞の増殖や転移の抑制剤、又は細菌（スタフィロコッカス・アウレウスV8等）やウイルス（ポリオウイルス、ヘルペスウイルス等）の増殖抑制剤として有用である。本発明のシステインプロテアーゼ阻害剤は、単独で使用しても良いが、公知の前記疾患の予防・治療剤、又は前記細菌・ウイルス増殖抑制剤と併用して使用することも可能である。併用することによって、前記疾患の予防・治療効果、又は前記細菌・ウイルス増殖抑制効果を高めることができる。併用する前記疾患の予防・治療剤、又は前記細菌・ウイルス増殖抑制剤は、本発明の組成物中に有効成分として含有させても良いし、本発明の組成物中には含有させずに別個の薬剤として組合わせて商品化して使用時に組み合わせても良い。

【0040】

本発明の飲食品組成物は、食品又は飲料にカゼイン加水分解物を添加して製造することができ、経口的に摂取することが可能である。飲食品組成物の形態としては、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果汁飲料、乳酸菌飲料等の飲料（これらの飲料の濃縮原液及び調整用粉末を含む）；アイスクリーム、シャーベット、かき氷等の氷菓；飴、チューインガム、キャンディー、ガム、チョコレート、錠菓、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子等の菓子類；加工乳、乳飲料、発酵乳、バター等の乳製品；パン；経腸栄養食、流動食、育

児用ミルク、スポーツ飲料；その他機能性食品等が例示される。

【0041】

本発明の飲食品組成物において、カゼイン加水分解物を添加する量は、飲食品組成物の形態によって適宜設定されるが、通常の商品又は飲料中0.005～80質量%、好ましくは0.05～60質量%となるように添加すればよい。

【0042】

本発明の飼料組成物は、飼料にカゼイン加水分解物を添加して製造することができ、一般的な哺乳動物や家畜類、養魚類、愛玩動物に経口的に投与することが可能である。飼料組成物の形態としては、ペットフード、家畜飼料、養魚飼料等が例示され、穀類、粕類、糠類、魚粉、骨粉、油脂類、脱脂粉乳、ホエー、鉱物質飼料、酵母類等とともに混合して本発明の飼料組成物を製造することができる。

【0043】

本発明の飼料組成物において、カゼイン加水分解物を添加する量は、飼料組成物の形態によって適宜設定されるが、通常の商品中0.005～80質量%、好ましくは0.05～60質量%となるように添加すればよい。

【0044】

ここで、本発明のシステインプロテアーゼ阻害剤の有効成分として使用したカゼイン加水分解物の製造例を以下に示す。

〔製造例1〕

市販牛乳カゼイン「アラシッド」（蛋白質含量90%、ニュージーランドミルクプロダクツ製）100gを60℃に加熱した精製水に10%濃度に懸濁し、2.5gの水酸化ナトリウムを加えて完全に溶解した。その後、85℃で10分間の殺菌を行い、溶解液を50℃に調整した後、加水分解酵素として、パンクレアチン（天野エンザイム社製、112,000U/g）を2500U添加し、50℃で4時間保持することによって加水分解し、90℃で10加熱処理して酵素を失活した後、凍結乾燥することによりカゼイン加水分解物約100gを得た。得られたカゼイン加水分解物の分解率は9.5%、数平均分子量は910ダルトンであった。

【0045】

[製造例 2]

市販カゼインナトリウム「アラネート」（蛋白質含量90%、ニュージーランドミルクプロダクツ製）100gを50℃に加熱した精製水に12%濃度に溶解した。その後、85℃で10分間の殺菌を行い、溶解液を40℃に調整した後、加水分解酵素として、ブタトリプシン（PTN6.0S；ノボザイム社製、1,250U/g）を250U添加し、40℃で6時間保持することによって加水分解し、90℃で10分間加熱処理して酵素を失活した後、凍結乾燥することによりカゼイン加水分解物約100gを得た。得られたカゼイン加水分解物の分解率は10.8%、数平均分子量は750ダルトンであった。

【0046】

次に試験例を示して本発明を詳細に説明する。

[試験例 1]

本試験は、カゼイン加水分解物のシステインプロテアーゼに対する阻害効果を測定するために行った。

【0047】

(1) 試料の調製

加水分解酵素としてパンクレアチンを、それぞれ2000、及び8000ユニット（units）添加して製造したこと以外は、製造例1と同一の方法により製造したカゼイン加水分解物を試験試料1及び試験試料2とした。尚、試験試料1及び試験試料2の分解率（%）は、それぞれ8.2及び14.0であった。また、試験試料1及び試験試料2の数平均分子量（ダルトン）は、それぞれ1020及び480であった。

【0048】

(2) 試験方法

0.1M酢酸緩衝液pH5.5に溶解した試験試料溶液に、基質としてZ-Phe-Arg-MCA（最終濃度20mM：ペプチド研究所社製）を添加し、システインプロテアーゼであるパパイン溶液（最終濃度：15units/ml）を添加して混合し、37℃で10分間反応させた後、消化を受けた基質から遊離した

AMCの蛍光強度（励起波長：370 nm、発光波長：460 nm）を蛍光分光度計（日立社製）を用いて測定した。

【0049】

（3）試験結果

本試験の結果は、表1に示すとおりである。表1は、各試験試料のシステインプロテアーゼ阻害活性を示す。その結果、試験試料1は、0.05 mg/mlの濃度でパパインのシステインプロテアーゼ活性を76%阻害し、0.5 mg/mlの濃度で100%阻害した。一方、試験試料2は、パパインのシステインプロテアーゼ活性を阻害しなかった。

【0050】

【表1】

試料	パンクレアチン添加量 (units)	分解率 (%)	数平均分子量 (ダルトン)	各濃度における阻害率 (%)		
				0.5 (mg/ml)	0.05 (mg/ml)	0.005 (mg/ml)
試験試料1	2000	8.2	1020	100	76	0
試験試料2	8000	14.0	480	0	0	0

【0051】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0052】

【実施例】

[実施例1]

（ウシカゼイン加水分解物を配合した錠剤の調製）

次の組成からなる錠剤のシステインプロテアーゼ阻害剤を次の方法により製造した。

【0053】

製造例1で製造したカゼイン加水分解物	40.0 (%)
乳糖（森永乳業社製）	18.5
トウモロコシ澱粉（日清製粉社製）	30.7
ステアリン酸マグネシウム（太平化学産業社製）	1.4

カルボキシメチルセルロースカルシウム (五徳薬品社製) 9. 4

【0054】

ウシカゼイン加水分解物、乳糖、トウモロコシ澱粉及びカルボキシメチルセルロースカルシウムの混合物に、滅菌精製水を適宜添加しながら均一に混練し、50℃で3時間乾燥させ、得られた乾燥物にステアリン酸マグネシウムを添加して混合し、常法により打錠し、錠剤を得た。

【0055】

[実施例2]

(ウシカゼイン加水分解物を添加した飲料の調製)

脱脂粉乳 (森永乳業社製) 90 g を 50℃ の温湯 800 ml に溶解し、砂糖 (日新製糖社製) 30 g、インスタントコーヒー粉末 (ネスレ社製) 14 g、カaramel (昭和化工社製) 2 g、及びコーヒーフレーバー (三栄化学社製) 0.01 g、を攪拌しながら順次添加して溶解し、10℃に冷却し、製造例1で製造したウシカゼイン加水分解物 1 g を添加し、ウシカゼイン加水分解物約 0.1% を含むシステインプロテアーゼ阻害効果を有する乳飲料を調製した。

【0056】

[実施例3]

(ウシカゼイン加水分解物を添加した経腸栄養食粉末の調製)

ホエー蛋白酵素分解物 (森永乳業社製) 10.8 kg、デキストリン (昭和産業社製) 36 kg、及び少量の水溶性ビタミンとミネラルを水 200 kg に溶解し、水相をタンク内に調製した。これとは別に、大豆サラダ油 (太陽油脂社製) 3 kg、パーム油 (太陽油脂社製) 8.5 kg、サフラワー油 (太陽油脂社製) 2.5 kg、レシチン (味の素社製) 0.2 kg、脂肪酸モノグリセリド (花王社製) 0.2 kg、及び少量の脂溶性ビタミンを混合溶解し、油相を調製した。タンク内の水相に油相を添加し、攪拌して混合した後、70℃に加温し、更にホモゲナイザーにより 14.7 MPa の圧力で均質化した。次いで、90℃で10分間殺菌した後に、濃縮し、噴霧乾燥して、中間製品粉末約 59 kg を調製した。この中間製品粉末 50 kg に、蔗糖 (ホクレン社製) 6.8 kg、アミノ酸混合粉末 (味の素社製) 167 g、及び製造例1で製造したウシカゼイン加水分解

物 60 g を添加し、均一に混合して、ウシカゼイン加水分解物を含有するシステインプロテアーゼ阻害効果を有する経腸栄養食粉末約 57 kg を製造した。

【0057】

【発明の効果】

以上詳記したとおり、本発明はカゼイン加水分解物を有効成分とするシステインプロテアーゼ阻害剤に関するものであり、本発明により奏される効果は次のとおりである。

- (1) 乳中に含まれるタンパク質の加水分解物であるので、食品素材として幅広く利用する点で優れ、日常的に長期間投与又は摂取が可能である。
- (2) システインプロテアーゼが関与する疾患の予防・治療剤として使用することが可能である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 食品素材として幅広く利用することが可能であり、且つシステインプロテアーゼが関与する疾患の予防・治療剤、並びに各種飲食品及び飼料等に利用することが可能なシステインプロテアーゼ阻害剤を提供する。

【解決手段】 乳由来のタンパク質であるカゼインの加水分解物を有効成分として含有するシステインプロテアーゼ阻害剤に関するものであり、骨粗鬆症、悪性腫瘍性高カルシウム血症等の予防・治療剤、並びに飲食品及び飼料等に利用することが可能なシステインプロテアーゼ阻害剤。

【選択図】 なし

特願 2003-147035

出願人履歴情報

識別番号

[000006127]

1. 変更年月日

1990年 9月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区芝5丁目33番1号

氏 名

森永乳業株式会社